

УДК 577.218

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ФЕНОФИБРАТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И СВЯЗАННЫЕ С НИМ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

А.П. Гуреев^{1}, М.Л. Шматкова¹, В.Ю. Башмаков¹, А.А. Старков², В.Н. Попов¹*

¹Воронежский государственный университет,
394006, Воронеж, Университетская пл., 1; факс: +7(473)220-87-55; эл. почта: gureev@bio.vsu.ru

²Университет Корнелл, Медицинский колледж Уэйла Корнелла, Нью-Йорк

Фенофибрат – синтетический лиганд активирующих пролиферацию пероксисом рецепторов подтипа альфа (PPAR α), который используется для лечения широкого спектра метаболических заболеваний, таких как гипертриглицеридемии, дислипидемии, диабеты, различного рода нейродегенеративные заболевания. Нами исследовано влияние фенофибрата на β -окисление жирных кислот и связанные с ним свободнорадикальные процессы. Наиболее эффективная концентрация фенофибрата (0,3%), добавленная в корм, приводила к значительному снижению массы тела у мышей. Данные, полученные методом количественного ПЦР, свидетельствуют об увеличении экспрессии генов печени, кодирующих ферменты β -окисления жирных кислот, протекающего как в пероксисомах, так и в митохондриях. Усиление окислительных процессов вдвое увеличивает скорость продукции активных форм кислорода (АФК), что подтверждается определением уровня содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени. При этом митохондриальные антиоксидантные системы более чувствительны к повышению продукции АФК, чем пероксисомные и цитоплазматические антиоксидантные системы. Об этом свидетельствуют увеличение экспрессии генов SOD2 и PRDX3 и отсутствие изменений в экспрессии генов CAT1, SOD1, PRDX5.

Ключевые слова: фенофибрат, β -окисление, пероксисомы, митохондрии, антиоксидантные системы

DOI 10.18097/PBMC20166204426

ВВЕДЕНИЕ

Транскрипционные факторы из семейства PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) играют ключевую роль в регуляции липидного метаболизма. Рецептор PPAR α , экспрессирующийся преимущественно в печени, выступает в качестве молекулярного сенсора эндогенных жирных кислот и их производных [1]. Этот лиганд-активируемый фактор транскрипции регулирует экспрессию генов, кодирующих ферменты и транспортные белки, участвующие в обмене липидов, что в итоге приводит к стимуляции окисления жирных кислот и улучшению метаболизма липопротеинов [2, 3]. Все рецепторы PPAR-типа образуют гетеродимер с ретиноидным X-рецептором (RXR), который впоследствии связывается со специфическим участком промотора гена мишени [1].

Природными лигандами PPAR α являются моно- и полиненасыщенные жирные кислоты, а также эйкозаноиды [4]. Синтетическими лигандами PPAR α являются фибраты, класс амфипатических карбоновых кислот, которые были впервые использованы для лечения гипертриглицеридемии [2, 5].

Рецептор PPAR α в значительных количествах экспрессируется в органах и тканях, которые характеризуются высоким уровнем катаболизма жирных кислот: в печени, скелетных мышцах (в основном в медленных волокнах окислительного типа), бурой жировой ткани, сердце и почках. Направленное разрушение гена, кодирующего PPAR α у мышей, позволило установить его значение,

закрывающееся в регуляции митохондриального и пероксисомального β -окисления жирных кислот [6].

Фенофибрат используется преимущественно для лечения дислипидемии и гипертриглицеридемии, стимулируя процессы липолиза [6]. Исследование фибратов на животных необходимо для понимания процессов регуляции метаболизма посредством транскрипционных факторов из семейства PPAR. Однако существуют различия в функционировании этого транскрипционного фактора у человека и грызунов. Так, у грызунов избыточная активация PPAR α большими дозами лигандов приводит к пролиферации пероксисом и развитию гепатокарциномы – это свойство присуще только мышиным PPAR α и не было подтверждено у человека [6, 7].

При изменении скорости окислительных процессов важно учитывать фактор продукции активных форм кислорода (АФК), которые являются основными повреждающими агентами во всех типах тканей.

Целью данной работы являлась оценка изменения экспрессии генов, кодирующих компоненты антиоксидантных систем таких органелл клетки, как пероксисомы и митохондрии, в которых преобладают окислительные процессы и которые вносят наибольший вклад в продукцию АФК. Также были произведены подбор и оптимизация концентрации фенофибрата, при которой наблюдался выраженный терапевтический эффект, проявляющийся в ускорении процессов окисления жирных кислот без значительных физиологических отклонений.

МЕТОДИКА

Лабораторные животные

В эксперименте использовали самцов мышей линии C57BL6 возрастом 6 месяцев, полученных из питомника филиала “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий. Мышей содержали в стандартных условиях при температуре +25°C и 12-ч световом дне при относительной влажности воздуха не ниже 40%. Животные были разбиты на группы по 6 животных (n=6). Опытные группы получали кормовую смесь комбикорма (“Ssniff Spezialdiäten GmbH”, Германия) с 0,5%, 0,3%, 0,2% и 0,15% фенофибрата (“Липантил® Ресифарм Фонтен”) и воду. Контрольная группа – чистый комбикорм и воду. Эксперимент продолжали в течение 10 дней, в ходе которых оценивали изменение массы тела животных.

Выделение тотальной РНК

Выделение тотальной РНК из печени мыши проводилось по модифицированной фенол-хлороформной методике. Ткань печени (100 мг) гомогенизировали в 2 мл буфера GuTC (Guanidine Thiocyanate extraction buffer), содержащего 4 М гуанидин тиоцианат, 10 мМ EDTA, 50 мМ Hepes, 5% β-меркаптоэтанол, pH 5,5. Экстрагирующая смесь содержала 1/10 объема 2 М ацетата натрия, 1/5 объема хлороформа и равный объем фенола. После центрифугирования в течение 15 мин при 7500 g проводили дополнительную экстракцию смесью фенол/хлороформ и чистым хлороформом с последующим центрифугированием 15 мин при 7500 g. Осаждение РНК проводили 3 объемами изопропилового спирта. Преципитацию проводили в течение 1 ч при температуре -20°C. После центрифугирования при 12000 g в течение 30 мин осадок промывали 80% этанолом. Качество

Таблица. Последовательности праймеров

№	Название гена	Последовательность
1	ACOX1	F: 5'-TAACTTCCTCACTCGAAGCCA-3'
		R: 5'-AGTTCATGACCCATCTCTGCC-3'
2	ACADVL	F: 5'-CTACTGTGCTTCAGGGACAAC-3'
		R: 5'-CAAAGGACTTCGATTCTGCCC-3'
3	ACADM	F: 5'-AGGGTTTAGTTTTGAGTTGACGG-3'
		R: 5'-CCCCGCTTTTGTCATATTCCG-3'
4	ETFDH	F: 5'-GTGCGACTAACCAAGCTGTC-3'
		R: 5'-GGATGAACAGTGTAGTGAGTGG-3'
5	CAT1	F: 5'-AGCGACCAGATGAAGCAGTG-3'
		R: 5'-TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG-3'
6	SOD1	F: 5'-AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC-3'
		R: 5'-CCACCAGTGTTCCTAGAGTGAGG-3'
7	SOD2	F: 5'-CAGACCTGCCTTACGACTATGG-3'
		R: 5'-CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT-3'
8	PRDX3	F: 5'-GGTTGCTCGTCATGCAAGTG-3'
		R: 5'-CCACAGTATGTCTGTCAAACA-3'
9	PRDX5	F: 5'-GGTTGCTCGTCATGCAAGTG-3'
		R: 5'-CCACAGTATGTCTGTCAAACA-3'
10	18s	F: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
		R: 5'-GCTGGAATTACTGTGGCT-3'

выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле, количество – спектрофотометрически по изменению оптической плотности при длине волны 260 нм. Очистку образцов РНК от примесей ДНК осуществляли на термоциклере “Eppendorf Mastercycler personal”. Состав реакционной смеси: общая РНК (3-5 мкг), 10× буфер с MgCl₂ (1 мкл), фермент DNase I, RNase free (Thermo scientific®) (1 ед.); деионизированная вода до объема 10 мкл. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C. Фермент инактивировали добавлением в смесь 50 мМ EDTA.

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции осуществляли на приборе Eppendorf Mastercycler personal. Смесь РНК (5 мкг), олиго(dT)₁₈ (0,5 мкг) и деионизированной воды инкубировали 5 минут при 70°C. После добавления 10× буфер (SybEnzyme®) (2 мкл); 10 мМ смесь dNTP (2 мкл) смесь инкубировали при 37°C. Для реакции обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу M-MuLV (SybEnzyme®) (40 ед.). Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч.

Количественный ПЦР-анализ

Количественный ПЦР-анализ проводили на приборе “Bio-Rad CFX96™ Real-Time System”. В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: qPCRmix-HS SYBR+ROX (5 мкл), комбинация ПЦР праймеров (прямой и обратный) (20 пМ); ДНК-матрица (12 нг). В качестве референсного гена использовали ген 18s рРНК (см. таблицу). Общую денатурацию проводили при 95°C 3 мин; денатурация в начале цикла 95°C 30 с; отжиг праймеров 61°C 30 с, элонгация 72°C 30 с; кол-во циклов 38; общая элонгация 72°C 5 с; кривая плавления от 65°C до 95°C. Количественно

нормализованную экспрессию генов выражали в относительных единицах флуоресценции (RFU). Последовательности праймеров приведены в таблице.

Определение уровня первичных продуктов ПОЛ

Диеновые конъюгаты экстрагировали смесью гептана с изопропиловым спиртом. Измерение экстинкции проводили на приборе "Спектрофотометр-102" при длине волны 233 нм. В качестве контроля использовались пробы, содержащие вместо 1 мл супернатанта 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6). Концентрацию диеновых конъюгатов определяли по формуле:

$$[ДК] = (V_{\text{общ}} \cdot D) / (L \cdot E \cdot V_{\text{внес}}),$$

где D – величина оптической плотности; L – длина оптического пути; E – коэффициент молярной экстинкции, равный $2,2 \cdot 10^5 \text{ [M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}]$.

Статистическая обработка

Для определения достоверности результатов определений применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента. В статье обсуждаются только статистически достоверные различия ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе было проведено определение оптимальной концентрации фенофибрат, при которой наблюдался терапевтический эффект препарата без выраженных физиологических отклонений. Концентрация фенофибрат (0,5%), добавленная в корм, оказалась токсической для организма, так как приводила к резкому снижению массы тела за период менее 3 дней и выраженным физиологическим отклонениям. Дальнейшее использование этой концентрации было признано

нецелесообразным. В опытных группах животных, получавших 0,2% и 0,15% фенофибрат, была отмечена небольшая потеря веса (5-7%), после чего наблюдалась частичное восстановление веса (рис. 1).

Использование 0,3% концентрации фенофибрат приводило к равномерному снижению массы тела в течение 10 дней эксперимента. На 3 день эксперимента масса тела в сравнении с контролем снизилась на 7,4% ($p \leq 0,05$). В конце эксперимента на 10 день у мышей опытной группы наблюдалась потеря веса на 16,3% ($p < 0,001$) (рис. 1). Эта концентрация и была использована для дальнейших исследований.

В качестве побочного эффекта приёма 0,3% фенофибрат наблюдалось заметное увеличение массы печени (более чем в 2 раза) ($p \leq 0,001$) (рис. 2). Печень, являясь основным регуляторным органом, ответственным за контроль метаболизма, наиболее подвержена влиянию различных синтетических препаратов, в том числе и фенофибрат. Известно, что пероксисомные пролифераторы индуцируют как гепатомегалию, так и гиперплазию печени [8]. Гепатомегалия регистрируется в первые дни после приема агонистов пероксисомных пролифераторов. На 3 день после приема фенофибрат у мышей наблюдалась гипертрофия печени. Отношение массы печени к массе тела животного составило 0,09, а у контрольной группы это соотношение было 0,04. Таким образом, было установлено, что отношение масса печени/масса мыши у опытной группы в сравнении с контролем выше в два раза.

Основным терапевтическим эффектом фенофибрат является обусловленное липолизом снижение массы тела. Усиление липолиза в основном связано с увеличением скорости деградации жирных кислот. Преобладающим процессом является β -окисление жирных кислот, которое происходит в четыре стадии и в котором участвуют пероксисомы, цитоплазма и митохондрии [9].

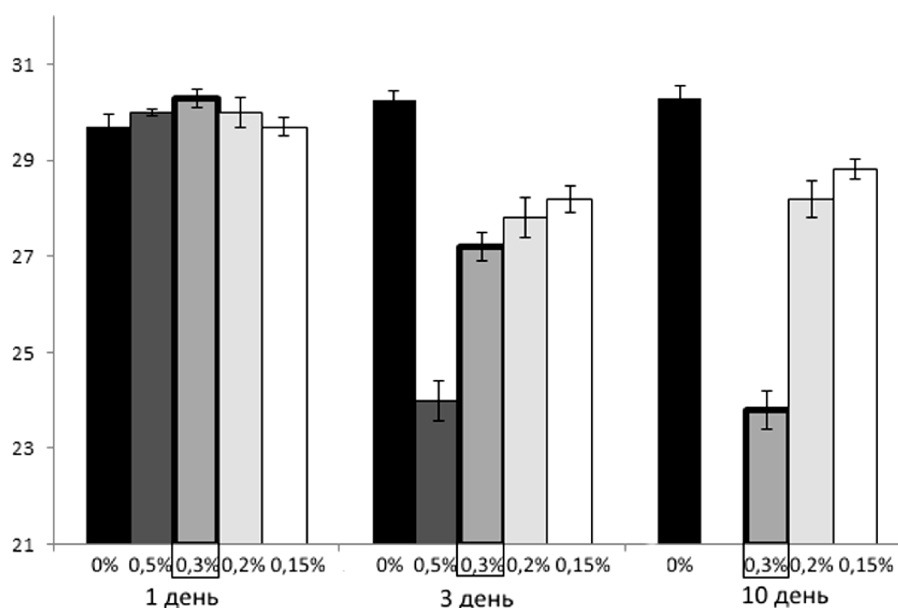


Рисунок 1. Изменение массы тела при приёме следующих концентраций фенофибрат: 0% (контроль), 0,5%, 0,3%, 0,2%, 0,15%.

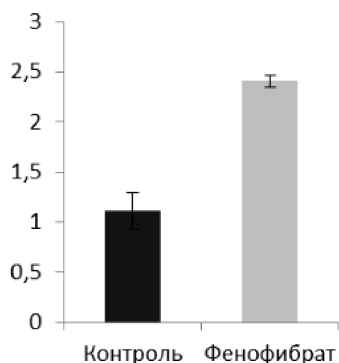


Рисунок 2. Изменение массы печени при приёме 0,3% фенофибрат в сравнении с контролем.

Отличие пероксисомального β -окисления от митохондриального заключается в том, что в ходе окисления не накапливаются восстановительные эквиваленты, поэтому реакции не сопряжены с образованием АТФ. Первую реакцию катализирует ацил-КоА-оксидаза (ACOX; КФ 1.3.3.6) – FAD-содержащий фермент, который поставляет электроны непосредственно на молекулярный кислород с образованием H_2O_2 [9]. В условиях эксперимента 0,3% фенофибрат вызывал 8-кратное увеличение экспрессии гена *ACOX1* (рис. 3).

Приём 0,3% фенофибрат также приводил к увеличению содержания диеновых конъюгатов в печени мыши на 47% ($p \leq 0,001$) по сравнению с контролем (рис. 4), что свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ. При этом не наблюдалось статистически достоверного увеличения экспрессии гена *CAT1*.

Первую стадию митохондриального β -окисления осуществляют ацил-КоА дегидрогеназы (КФ 1.3.1.8), действующие на ацильные группы различной длины [9]. Данные, полученные методом

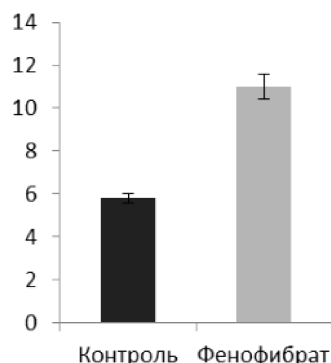


Рисунок 4. Изменение концентрации диеновых конъюгатов в печени мыши при приёме 0,3% фенофибрат в сравнении с контролем.

количественного ПЦР-анализа, показывают 20-кратное увеличение экспрессии гена очень длинноцепочечной ацил-КоА дегидрогеназы (very long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase) (*ACADVL*) ($p \leq 0,05$) и 30-кратное увеличение экспрессии среднецепочечной ацил-КоА дегидрогеназы (medium-chain acyl-CoA dehydrogenases) (*ACADM*) ($p \leq 0,05$), что свидетельствует в пользу значительного увеличения активности процессов митохондриального β -окисления (рис. 3).

При приёме 0,3% фенофибрат отмечено 8-кратное увеличение экспрессии гена *ETFDH* ($p \leq 0,05$), кодирующего электронпереносающий флавопротеин, который участвует в переносе восстановительных элементов в дыхательной цепи [6, 9]. На основании этих данных можно предположить, что увеличение активности митохондриального β -окисления приводит к усилению нагрузки на электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) митохондрий, и это может быть причиной увеличенной продукции АФК.

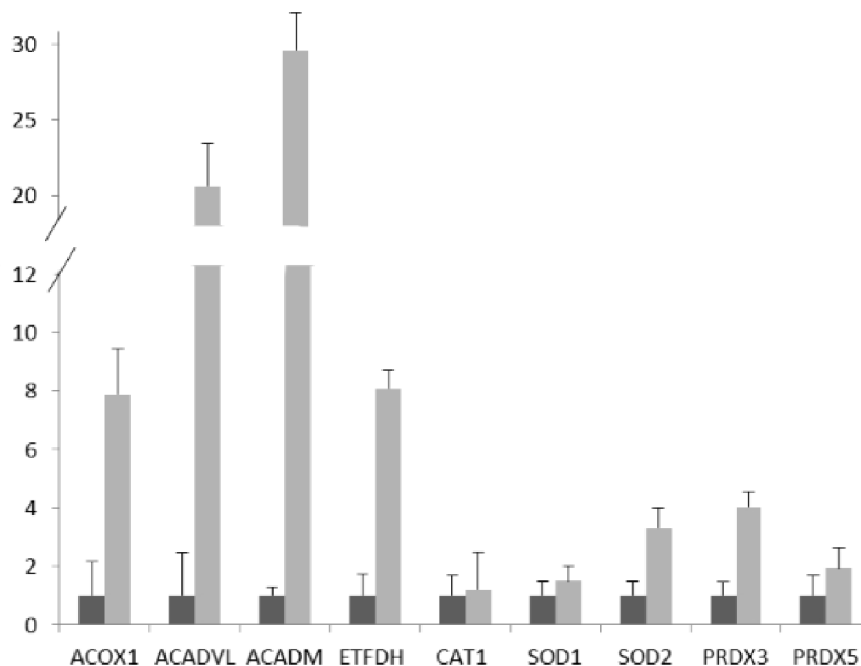


Рисунок 3. Изменение экспрессии генов, участвующих в β -окислении и генов антиоксидантных систем при приёме 0,3% фенофибрат в сравнении с контролем.

Митохондрии обладают сложной сетью ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем. Одним из представителей ферментативным антиоксидантов является Mn-зависимая супероксиддисмутаза (MnSOD, или SOD2) (КФ 1.15.1.1), расположенная исключительно в матриксе митохондрий, которая защищает их от свободных радикалов [10]. Проведённые исследования показали, что экспрессия гена *SOD2* возросла в три раза ($p \leq 0,05$). Статистически значимых изменений в экспрессии *SOD1*, кодирующего цитоплазматический фермент (SOD1), не наблюдалось. Такая же зависимость наблюдается и в экспрессии генов пероксиредоксинов (PRDX) (КФ 1.11.1.15), кодирующих другое семейство антиоксидантных белков. Экспрессия гена *PRDX3*, белковый продукт которого функционирует исключительно в митохондриях, возросла в 4 раза ($p \leq 0,05$). В то же время, уровень экспрессии гена, кодирующего *PRDX5*, разные изоформы которого локализованы в митохондриях, цитоплазме и пероксисомах, не изменился (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондрии являются удобной фармакологической мишенью для различных препаратов. В нашем исследовании показано, что использование синтетических лигандов факторов транскрипции, таких как фенофибрат, оказывает положительное влияние на экспрессию генов, ответственных за β -окисление жирных кислот. Однако это приводит не только к усилению интенсивности энергетического обмена, но и к увеличению нагрузки на ЭТЦ митохондрий печени, что сопровождается повышенной продукцией АФК и способствует перекисному окислению липидов. В ответ на усиление

окислительного стресса происходит увеличение экспрессии генов, кодирующих митохондриальные белки/ферменты, участвующие в утилизации АФК. Это свидетельствует о значительной эволюционной адаптации митохондрий к изменяющейся скорости β -окисления жирных кислот, сопряженной не только с генерацией АТФ, но и образованием АФК.

Данная работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственное задание № 6.149.2014/К и 1035), РФФИ (грант 13-04-97524 *рег_центр_а*) и Российским научным фондом (соглашение 14-14-00181).

ЛИТЕРАТУРА

1. Desvergne B., Wahli W. (1999) *Endocrine Reviews*, **20**, 649-688.
2. Berger J., Moller D.E. (2002) *Ann. Rev. Med.*, **53**, 409-435.
3. Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M., Kersten S. (2010) *PPAR Research*, **2010**, 1-20.
4. Nakamura M.T., Yudell B.E., Loor J.J. (2014) *Progr. Lipid Res.*, **53**, 124-144.
5. Willson T.M., Brown P.J., Sternbach D.D., Henke B.R. (2000) *J. Med. Chem.*, **43**, 527-550.
6. Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B. (2006) *J. Clin. Invest.*, **116**, 571-580.
7. Rogue A., Spire C., Brun M., Claude N., Guillouzo A. (2010) *PPAR Research*, **2010**, 1-16.
8. Bentley P., Calder I., Elcombe C., Grasso P., Stringer D., Wiegand H.J. (1993) *Food Chem. Toxicol.*, **31**, 857-907.
9. Reddy J.K., Hashimoto T. (2001) *Ann. Rev. Nutr.*, **21**, 193-230.
10. Андреев Ю.А., Кушнарева Ю.В., Старков А.А. (2005) *Биохимия*, **70**, 246-264.

Поступила: 05. 11. 2014.
Принята к печати: 15. 04. 2015.

THE EFFECT OF FENOFIBRATE ON EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN FATTY ACIDS BETA-OXIDATION AND ASSOCIATED FREE-RADICAL PROCESSES

A.P. Gureev¹, M.L. Shmatkova¹, V.Yu. Bashmakov¹, A.A. Starkov², V.N. Popov¹

¹Voronezh State University,
1, University sq., Voronezh, 394006 Russia; fax: +7(473)220-87-55; e-mail: gureev@bio.vsu.ru
²Cornell university, Weill Cornell Medical College, New York

Fenofibrate is a synthetic ligand for peroxisome proliferator-activated receptors subtype alpha (PPAR α); it is used for the treatment of a wide range of metabolic diseases such as hypertriglyceridemia, dyslipidemia, diabetes and various neurodegenerative diseases. We have studied the effect of fenofibrate on β -oxidation of fatty acids and related free-radical processes. The most effective concentration of fenofibrate (0.3%) added to the chow caused a significant decrease of the body weight of mice. The data obtained by quantitative PCR demonstrated increased hepatic gene expression responsible for β -oxidation of fatty acids in peroxisomes and mitochondria. Enhancement of oxidative processes caused a 2-fold increase in the rate of reactive oxygen species (ROS) production, as evidenced by determination of the level of lipid peroxidation (LPO) products in the liver. Mitochondrial antioxidant systems are more sensitive to elevated ROS production, as they respond by increased expression of *SOD2* and *PRDX3* genes, than cytoplasmic and peroxisomal antioxidant systems, where expression of *CAT1*, *SOD1*, *PRDX5* genes remained unaltered.

Key words: fenofibrate, β -oxidation, peroxisome, mitochondria, antioxidant systems